

## آزمایش: استخراج DNA

### روش استخراج DNA از نمونه ها (روش جوشاندن یا **BOILING**):

- مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه و یا کنترل در شرایط کاملاً استریل به لوله اپندرف وارد و درب آن بسته می شود.
- در حرارت آب جوش به مدت ۱۵ دقیقه قرار می گیرد.
- در پایان لوله در دور ۱۰۰۰۰ به مدت دو دقیقه سانتریفوژ می گردد .
- سوپرناتانت مربوطه در شرایط استریل در دو لوله دیگر وارد و یکی جهت اندازه گیری محتوای DNA نمونه و دیگری به عنوان الگو برای PCR مورد استفاده قرار میگیرد.

## آزمایش: استخراج DNA

### روش استخراج DNG-Plus شرکت سیناژن:

- در لوله اپندرف ۲ میلی لیتر و در زیر هود بیولوژیک ۱۰۰ میکرولیتر از خون کامل (گرفته شده روی ضدانعقاد EDTA در لوله آماده) با مقدار ۷۰۰ میکرولیتر محلول DNG-Plus مخلوط و به مدت ۲۰-۱۵ ثانیه ورتکس گردد تا سوسپانسیون همگنی ایجاد شود. هرگونه اگرگیت و یا لخته با پی پت گرفته و خارج شود.
- سپس مقدار ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول به مخلوط قبلی اضافه و سپس به آرامی ۱۰ بار سروته شود و آنگاه به مدت ۱۰ دقیقه در میکروفیوژ با دور 12/0000 rpm سانتریفوژ گردد.
- بعد سوپرناتانت تخلیه و لوله به مدت چند ثانیه بطور معکوس روی کاغذ صافی قرار داده شود. (برای هر نمونه یک کاغذ صافی کوچک و مجزا استفاده شود).
- مقدار یک میلی لیتر اتانول ۷۵٪ به پلت هر لوله وارد و به آرامی لوله ۱۰ بار سروته شده و بعد آن را به مدت ۵ دقیقه در دور 12/000 rpm سانتریفوژ مینمائیم. این مرحله یک بار دیگر نیز تکرار شود.
- بعد اتانول موجود در هر لوله بطور کامل تخلیه و پلت آن در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد روی دستگاه Heat Block به مدت ۵ دقیقه کاملاً خشک شود.
- سپس DNA موجود در پلت در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر استریل حل و خوب ورتکس شود و مجدداً به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار داده شود.

- مواد حل نشده در جداره لوله حل و مواد غیرقابل حل با سانتریفوژ لوله در دور 12/000 rpm رسوب داده شود.
- سوپر ناتانت که حاوی DNA خالص بوده در لوله‌های مجزا (دو لوله) وارد و با شماره‌گذاری در فریزر ۸۶- درجه سانتی‌گراد، نگهداری گردد.

بسمه تعالی  
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی  
دانشکده بهداشت و پیراپزشکی  
گروه علوم آزمایشگاهی  
دستورالعمل آزمایشگاه ملکولی

## آزمایش: استخراج DNA

# استفاده از روش استخراج Diatom DNA Prep 100

محتویات کیت:

Lysis Reagent  
Saline Buffer  
Nucleose  
Extra GeneE

### مراحل استخراج DNA:

- ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه هموژن را داخل یک میکروتیوب ۱/۵ml می‌ریزیم. به میزان ۴۰۰ میکرولیتر از Lysis reagent به نمونه اضافه کرده و مخلوط را ۸-۱۰ بار سروته می‌کنیم تا همگن شود.
- سپس نمونه‌ها را داخل انکوباتور ۶۵ درجه به مدت ۵ دقیقه قرار داده پس از آن ۲۰ میکرولیتر از Nucleose را به تمامی نمونه‌ها اضافه می‌کنیم.
- باید توجه داشته باشیم که Nucleose حاوی پودر شیشه بوده و به سرعت رسوب می‌دهد لذا بایستی قبل از استفاده به مدت ۳۰ ثانیه از طریق ورتکس مخلوط گردد تا به صورت همگن درآمده و مورد استفاده قرار گیرد.
- بعد از اضافه کردن Nucleose نمونه‌ها را در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه با بالا و پایین کردن هم می‌زنیم.
- سپس به مدت ۱۰ ثانیه در سرعت ۵۰۰۰g سانتریفوژ کرده، مایع رویی را دور ریخته و به رسوب حاصل ۲۰۰ میکرولیتر از Lysis Reagent اضافه کرده و ورتکس می‌کنیم تا خوب همگن شوند.
- سپس به محیط همگن شده ۴۰۰ میکرولیتر از Saline Buffer اضافه کرده و هم می‌زنیم.

- نمونه‌ها را به مدت ۱۰ ثانیه در سرعت ۵۰۰۰g سانتریفوژ کرده مایع رویی را دور می‌ریزیم.
- به رسوب باقی‌مانده ۵۰۰ میکرولیتر از Saline Buffer اضافه کرده، نمونه‌ها را ورتکس می‌کنیم.
- مجدداً به مدت ۱۰ ثانیه در ۵۰۰۰g سانتریفوژ انجام داده و پس از دور ریختن مایع رویی لوله‌ها را به صورت در باز به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهیم.
- در صورت خشک شدن کامل تیوب و عدم بوی الکل کار انکوبه شدن خوب انجام شده است.
- به لوله‌های خشک شده ۷۵ میکرولیتر از ماده Extra gene E اضافه کرده و با ورتکس مخلوط می‌کنیم.
- این ماده DNA را از Nucleose جدا می‌کند.
- نمونه‌ها به همین صورت به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۵ درجه قرار می‌گیرند.
- پس از اتمام زمان انکوباسیون نمونه‌ها ورتکس شده و سپس با سرعت ۱۰۰۰۰g به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ می‌شوند.
- در مرحله آخر مایع رویی حاصل از سانتریفوژ را که حاوی DNA می‌باشد بر داشته و به یک تیوب استریل منتقل می‌کنیم.
- این نمونه را می‌توان در دمای ۲۰- درجه تا سالها نگهداری کرد.

بسمه تعالی  
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی  
دانشکده بهداشت و پیراپزشکی  
گروه علوم آزمایشگاهی  
دستورالعمل آزمایشگاه ملکولی

## **آزمایش: BASIC PCR PROTOCOL**

# **BASIC PCR PROTOCOL**

Add the following components to a sterile 0.5ml microcentrifuge tube sitting on ice:

components	Volume
Autoclaved DW	14 microL
10x PCR buffer	2.5 microL
10mM d NTPmix	0.5 microL
50mM mgcl 2	0.75 microL
Forward primer	1 microL
Reverse primer	1 microL
Taq DNA POL	0.2 microL
Mineral oil	25 microL

- Mix & quick spin
- Add 5 micL Template DNA underneath the mineral oil
- ((Do the same protocol for Neg,control: Add in last stage only 5 micL DW))

### **THERMAL CYCLES**

(35 cycles)

- DENATURATION: 93°C (30 sec.)
- ANNEALING: 53°C (45 sec.)
- EXTENTION: 72°C (60 sec.)

## آزمایش: الکتروفورز DNA

### الکتروفورز DNA

#### تهیه ژل آگارز:

- ۱- قالب ژل را آماده کنید.
- ۲- شانه ای با دنده های مناسب روی قالب قرار دهید .
- ۳- حجم ژل مورد نظر را تعیین کنید ( اندازه گیری طول و عرض قالب و قطر ژل مورد نظر ).
- ۴- پودر آگارز را وزن کنید.
- ۵- آگارز را در بافر 1xTBE حل کنید و آن را حرارت داده تا خوب بجوشد و قبل از خنک شدن به ازای هر ۱۰ میلی لیتر ژل یک میکرولیتر از محلول ۱۰ mg/ml اتیدیوم بروماید اضافه کنید سپس آن را خوب مخلوط کرده و داخل قالب بریزید .
- 1xTBE= 89mM Tris base, pH8, 89mM boric acid, 2.5mM EDTA, pH8
- ۶- بعد از بسته شدن ژل آن را از قالب خارج کرده و داخل تانک الکتروفورز قرار دهید.
- ۷- هر ۵ میکرولیتر نمونه را با یک میکرولیتر بافر نمونه مخلوط کرده و داخل چاهک های ژل بریزید .

## قدرت جداسازی مولکولهای DNA توسط غلظتهای مختلف آگارز:

قدرت جداسازی DNA	درصد آگارز
۱۰۰۰-۱۰۰bp	۳
۱۵۰۰-۲۰۰bp	۲
۳۰۰۰-۳۰۰bp	۱.۵
۵۰۰۰-۵۰۰bp	۱
۷۰۰۰-۱۰۰۰bp	۰.۸
۳۰-۱۰kbp	۰.۶
۵۰-۳۰kbp	۰.۴

### روش الکتروفورز محصولات PCR و شناسایی آنها:

مقدار ۰/۶ گرم از پودر آگارز خالص را توزین نموده و در ارلن مایر ۱۰۰ سی سی وارد و سپس به آن مقدار ۴۰ سی سی از بافر TEB (1x) اضافه و مخلوط و سپس به کمک حرارت جوشانده می شود و بعد اجازه می دهیم تا سرد و به حرارت حدود ۵۰ درجه برسد و سپس مقدار ۴ میکرولیتر از اتیدیوم بروماید به این محلول اضافه می نماییم (می توان اتیدیوم بروماید را به طور جداگانه ساخت و در پایان کار ژل آگارز را در این محلول غوطه ور کرد که روش مناسب و ایمن تری است). در جایگاه (cosd) مربوطه یک شانه (۱۰ دندانه) نزدیک به یکی از دو انتها قرار داده و سپس محلول ژل فوق الذکر را به طور کامل در این جایگاه تخلیه نموده و حدود ۲۰ دقیقه منتظر می شویم تا کاملاً بگیرد. در تانک الکتروفورز ساب مارین مقدار ۴۰۰ میلی لیتر از بافر TEB اشاره شده در بالا وارد می کنیم و جایگاه و ژل بسته شده مورد اشاره در داخل این بافر می گیرد به طوری که شانه آن به طرف قطب منفی باشد و در این حال به آرامی شانه از داخل ژل خارج می شود از ایجاد حباب و یا حالت غیریکنواختی باید پرهیز نمود.

## LOADING

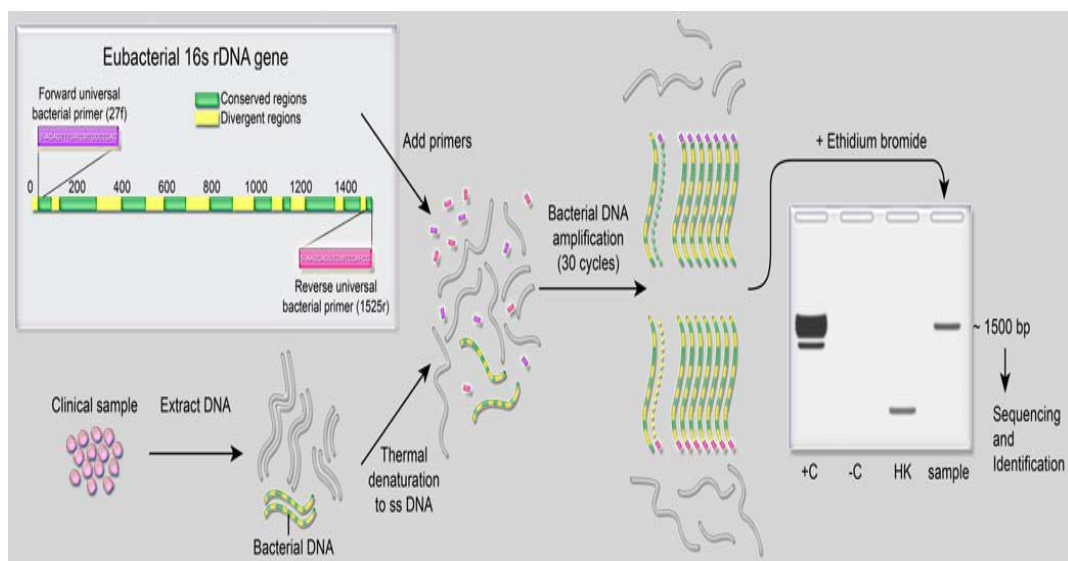
- در میکرووول ها و یا روی یک پارافیلیم تمیز مقدار ۲ میکرولیتر از محلول لودکننده (Loading buffer) قرار داده و از هر لوله حاصل از واکنش PCR (از محصولات ARMS-PCR) مقدار ۱۰ میکرولیتر برداشته و به ۲ میکرولیتر فوق اضافه و چندین بار مخلوط کرده و در نهایت مقدار ۱۰ میکرولیتر از حاصل این مخلوط به آرامی به ته هر چاهک مشخص اضافه می شود. در هر ران الکتروفورز یک نمونه کنترل به همراه هتروزیگوت و هموزیگوت و یک نمونه کنترل و نیز یک چاهک به محلول Ladder ۱۰۰bp (نظیر نمونه ها و با همان مقادیر) اختصاص داده شد.



- سیم‌های تانک الکتروفورز به پاورسپلای (منبع تغذیه) متصل و دستگاه روی ۸۰ ولت تنظیم و به مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز گردد.

## TRANSILLUMINATION

- ژل روی دستگاه ترانس ایلومیناتور قرار داده شود (و یا در محلول اتیدیوم بروماید شناور و سپس روی دستگاه قرار داده شود) و با بستن درب محافظ دستگاه و استفاده از عینک مخصوص باندها مورد بررسی قرار گیرد. در ضمن از هر ژل با استفاده از دوربین دیجیتال عکس گرفته و روی رایانه وارد و حفظ گردد. و یا میتوان از دستگاه gel documentor استفاده کرد.



آزمایش: **DNA assay**

- take a known quantity of a DNA preparation
- dilute in double distilled water to a determined extent
- place an aliquot of the solution into a suitable cuvette( **Use quartz cuvettes in the UV range. Handle them with caution! )**
- measure the absorbances at 260 nm and 280 nm in a light spectrometer
- do the division.

### Principles of Nanodrop

- the sample droplet is held in place by surface tension when it is slightly compressed between the pedestal and the sample arm; this generates the defined pathway of 1 mm. The spectrum measurement is then performed with two optical fibers installed in the pedestal (emitting light of a Xenon lamp) and the sample arm (spectrometer with linear CCD array). Quantification is performed based on the spectrum measurement at the defined pathway of 1 mm
- the sample droplet is held in place by surface tension when it is slightly compressed between the pedestal and the sample arm; this generates the defined pathway of 1 mm. The spectrum measurement is then performed with two optical fibers installed in the pedestal (emitting light of a Xenon lamp) and the sample arm (spectrometer with linear CCD array). Quantification is performed based on the spectrum measurement at the defined pathway of 1 mm

بسمه تعالی  
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی  
دانشکده بهداشت و پیراپزشکی  
گروه علوم آزمایشگاهی  
دستورالعمل آزمایشگاه ملکولی

## آزمایش: واکنش‌های ARMS

### روش و شرایط PCR و واکنش‌های ARMS

در بررسی هر کدام از موتاسیون‌ها برای هر بیمار دو میکروتیوب با عنوان M (موتانت) و N (نرمال) در نظر گرفته شود. به هر یک از میکروتیوب‌ها هر جزء به شرح ذیل (با واحد میکرولیتر) وارد شود:

DW : 16.25  
10 X PCR buffer : 2.5  
50 m M Mg Cl<sub>2</sub> : : 1. 25  
10 m M d NTP mix : : 0.5  
Taq DNA pol. : : 0.5  
Common primer : 1

نهایتاً از پرایمرهای اختصاصی هر موتاسیون (پرایمر N و M) به هر کدام از لوله‌های N و M به میزان ۱ میکرولیتر اضافه شود. به این ترتیب که به لوله M، پرایمر موتانت یا M و به لوله N، پرایمر نرمال یا N اضافه شود. در مرحله آخر به میزان ۲ میکرولیتر از DNA بیمار که قبلاً استخراج شده به عنوان template اضافه شود.

**آزمایش: \_ Digestion of PCR products directly after amplification**

**Digestion of PCR products directly after amplification**

■ Add:

PCR reaction mixture : 10 micL

Nuclease-free water : 18 micL

10X buffer R : 2 micL

RE(Hae III) : 1-2 micL

Mix gently and spin down for a few seconds.

- Incubate 37 Deg. For 1-16 hours
- Thermal inactivation at 80 deg. For 20 min

*Restriction endonuclease digestions. Five microliters of each PCR product was digested with different restriction enzymes in appropriate restriction enzyme buffer in a total volume of 20  $\mu$ L. After incubation for 2 h at the recommended temperature, the digested DNA was electrophoresed on a 6% polyacrylamide gel.*

**هضم DNA با آنزیم های محدودکننده (restriction digestion)** ( کارها روی یخ انجام گیرد):

هر یک از آنزیمهای محدودکننده ( برش دهنده ) مترادف خاصی را روی رشته DNA شناسایی کرده و دورشته DNA را برش میدهند. آنزیمهای محدودگر در مهندسی ژنتیک از اهمیت بالایی برخوردارند و در حقیقت شبیه چاقوی جراحی برای مهندسان ژنتیک میباشند ( به جدول آنزیمها مراجعه شود ).

۱- مقدار پلاسمید را تخمین بزنید ( یک واحد آنزیم مقدار یک میکرو گرم DNA را در حرارت مناسب در مدت یک ساعت هضم میکند و یک میکرو گرم DNA را در یک واکنشی به حجم ۲۰-۳۰ میکرو لیتر با آنزیم هضم کنید).

۲- با آب مقطر حجم آن را به ۱۸ میکرو لیتر ( یا هر حجم مورد نظر ) برسانید.

۳- لوله واکنش را spin کنید .

۴- مقدار ۲ میکرو لیتر از 10x Reaction buffer به واکنش اضافه کنید (غلظت نهایی بافر 1x باشد).

۵- با استفاده از سرسمپلر استریل و سرد مقدار آنزیم مورد نظر را به واکنش اضافه نمایید ( این مقدار آنزیم باید در حجم نهایی در نظر گرفته شده باشد).

۶- با ضربه نوک انگشت واکنش را مخلوط کرده و سپس spin نمایید.

۷- مدت یک تا دو ساعت در حرارت مناسب انکوبه کنید.

مقدار ۱۵ میکرو لیتر از واکنش را با ۳ میکرو لیتر loading buffer مخلوط کرده و روی ژل آگارز با درصد مناسب الکتروفورز نمایید ( از Intact plasmid DNA بعنوان کنترل واکنش روی ژل در کنار نمونه الکتروفورز شود توجه : اگر DNA هضم نشده است آن را P.C.I extraction نموده و با الکل رسوب داده و واکنش را تکرار کنید ).

آزمایش: استخراج پلاسمید در مقیاس کم

استخراج پلاسمید در مقیاس کم  
( Miniprep )

روش کار:

۱- مقدار ۱/۵ میلی لیتر کشت شبانه ( باکتری حاوی پلاسمید) را بمدت ۵ دقیقه با 4500rpm سانتریفیوژ کنید . عده ای معتقدند چنانچه رسوب را با محلول STE سوسپانسیون کرده و دوباره سانتریفیوژ کنیم ( شستشو دهیم ) واکنش های آنزیمی بهتر انجام میشود.

[STE = 100mM NaCl , 10 mM Tris ( pH=8) , 1mM EDTA (pH=8 )

۲- رسوب را در 100µl محلول I سوسپانسیون ( محلول روی یخ سرد شده باشد ).

محلول I : ۵۰ pH EDTA , 10 mM Tris , ۸ mM glucose

۳- میکرو فیوژ حاوی واکنش را مدت ۱۰-۵ دقیقه در هوای اتاق قرار دهید.

۴- مقدار 200µl از محلول II تازه تهیه شده به لوله واکنش اضافه کرده ، درب لوله را ببندید و با وارونه کردن آن محلول را خوب مخلوط کنید و ۵ دقیقه روی یخ قرار دهید.

محلول II : ۰.۲% SDS , 1% NaOH , N

۵- مقدار  $150\mu\text{l}$  از محلول III (سردشده روی یخ) به لوله واکنش اضافه کنید. درب لوله را بسته و به آهستگی ۱۰ دفعه آن را وارونه کنید و بمدت ۱۵ دقیقه روی یخ قرار دهید.

محلول III : ۶۰ میلی لیتر 5M AcoK , اسید استیک ۱۱/۵ میلی لیتر, آب مقطر ۲۸/۵ میلی لیتر ( این محلول دارای ۳مولار پتاسیم و ۵ مولار استات است ) وقتی این محلول به واکنش اضافه می شود باید یک رسوب سفید رنگ در داخل لوله پدیدار گردد .

۶- مدت ۲۰ دقیقه با  $12000\times g$  آن را سانتریفیوژ کنید.

۷- محلول رویی (تقریباً " ۴۵۰ میکرو لیتر ) را به لوله دیگر انتقال دهید( حاوی پلاسمید می باشد).

۸- سدیم استات با غلظت نهایی 0.3M به آن اضافه کنید ( عده ای این مرحله را ضروری نمیدانند ).

۹- دو برابر حجم آن اتانل مطلق سرداضافه کنید.

۱۰- مدت ۱۵ دقیقه آن را سانتریفیوژ کنید تا plasmid DNA رسوب کند . الکل را حذف کنید ( حتماً " لوله را وارونه روی کاغذجاذب الرطوبه قرار دهید ).

۱۱- روی رسوب الکل ۷۰درجه ( ۱۰۰ میکرلیتر) اضافه کنید و آن را ورتکس کنید بطوریکه pellet کنده شده و در الکل شناور شود.

۱۲- مدت ۳دقیقه در حرارت اتاق آن را سانتریفیوژ کنید ( شستشو دادن با الکل ).

۱۳- الکل را خالی کرده ورسوب را در حرارت ۷۰ درجه خشک کنید .

۱۴- رسوب را در ۵۰ میکرولیتر آب یا بافر ( TE ) حل کنید.

TE= 10mM Tris pH 8 , 1mM EDTA pH 8

آزمایش: تهیه سلول پذیرا

## تهیه سلول پذیرا ( Competent cell )

### روش کار:

- ۱- یک کلنی از باکتری مورد نظر را در ۳ میلی لیتر محیط LB کشت داده و یک شب در ۳۷ درجه روی شیکرانکوبه کنید .
۲. یک حجم از کشت شبانه باکتری مورد نظر را در ده حجم محیط LB کشت دهید ( بنا به دلایلی که بعداً توضیح داده میشود در این کارگاهها از دو سویه HB101 و XL1-blue باکتری E.coli که خصوصیات آنها نیز توضیح داده خواهد شد استفاده میگردد).
۳. مدت ۲.۵ ساعت در حرارت و rpm مناسب آن را Shake کنید تا به  $OD_{600} = 0.6$  برسد.
۴. مقدار یک میلی لیتر آن را به لوله میکروپیوژ انتقال دهید.
۵. لوله حاوی سلول را ده دقیقه روی یخ قرار دهید.
۶. مدت ۵ دقیقه با 3500rpm سانتریفیوژ کنید ( بهتر است در ۴ درجه انجام شود ).
۷. مایع رویی را خالی کرده و لوله را وارونه روی کاغذ جاذب الرطوبه قرار دهید تا آب آن خارج شود.
۸. رسوب را بایک سوم حجم اولیه از محلول 100mM CaCl<sub>2</sub> سوسپانسیون کنید ( محلول نباید ورتکس شود بلکه با ضربه انگشت آن را حل کنید) و ده دقیقه روی یخ قرار دهید.
۹. مانند مرحله ۵ آن را سانتریفیوژ کرده و محلول رویی را خالی کنید.



۱۰. رسوب را با یک دوازده ونیم حجم اولیه محلول  $\text{CaCl}_2$  سوسپانسیون کنید. ( با ضربه دست )

آن را درون میکروپیوژ های مناسب تقسیم کرده و برای Transformation استفاده کنید.

## آزمایش: Transformation

### Transformation ( انتقال Plasmid DNA به باکتری زنده )

هدف از آموزش این قسمت کسب مهارت لازم برای انتقال پلاسمید به سلول باکتری می باشد . این کار در بیولوژی مولکولی از اهمیت بالایی برخوردار است . برای کار کردن با ژنها باید حتماً آن ژن در یک پلاسمید کلون شود و سپس پلاسمید نو ترکیب (Recombinant plasmid) به سلول باکتری منقل شود تا پس از همانند سازی پلاسمید، ژن ( DNA ) کلون شده در پلاسمید نیز به تبع آن همانند سازی کند .

۱. سلول پذیرا ( Competent cell ) را روی یخ قرار دهید.

۲. Plasmid DNA مورد نظر را ( 5ng ) به آن اضافه کرده خوب مخلوط کنید ( بنا به دلایلی که بعداً توضیح داده میشود در این کارگاهها از دوپلاسمید pBR322 و Bluescript که خصوصیات آنها نیز توضیح داده خواهد شد استفاده میگردد).

۳. - لوله حاوی سلول پذیرا ( Competent cell ) را بمدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار دهید .

۴. - واکنش را بمدت ۴۰ ثانیه در آب گرم ۴۲ درجه قرار دهید ( شوک گرما ).

۵. - مدت ۱-۲ دقیقه روی یخ قرار دهید.

۶. - مقدار ۲۰۰ میکرولیتر محیط LB ( بدون آنتی بیوتیک ) به آن اضافه کرده و ۴۰-۶۰ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه کنید (باکتری E.coli هر ۲۰ دقیقه یک نسل تکثیر میکند و در اینجا به آن فرصت داده میشود تا دو یا سه نسل تکثیر نماید ).

۷- بصورت زیر روی آگار پلیت پخش کنید ( توجه : همه محتوای لوله را روی پلیت خالی کرده و با Spreader آن را روی سطح آگار داخل پلیت پخش کنید):

پلیت A : DNA Competent cell+ plasmid و آنتی بیوتیک مناسب.

پلیت B : Competent cell ( آگار حاوی آنتی بیوتیک است ).

پلیت C : Competent cell ( آگار فاقد آنتی بیوتیک است ).

۸- پلیت را به انکوباتور منتقل کرده و در ب آنها را نیمه باز بگذارید تا سطح پلیتها خشک شود.

۹- . پلیت هارا بصورت وارونه یک شب در حرارت ۳۷ درجه انکوبه کنید.

۱۰- اگر پروسه کار خوب انجام شده باشد بعد از ۱۲ ساعت روی سطح پلیت کلنی ها ظاهر می شوند.